(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
23.12.1998 Patentblatt 1998/52

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C07K 14/575, C07K 7/06,  
C07K 14/47, A61K 38/22

(21) Anmeldenummer: 98110629.7

(22) Anmeldetag: 10.06.1998

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 17.06.1997 DE 19725619

(71) Anmelder:  
FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER  
ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V.  
80636 München (DE)

(72) Erfinder:  
• Kapurnioutu, Afroditi  
72074 Tübingen (DE)

• Bernhagen, Jürgen  
72074 Tübingen (DE)  
• Brunner, Herwig  
70569 Stuttgart (DE)

(74) Vertreter:  
Pfenning, Meinig & Partner  
Mozartstrasse 17  
80336 München (DE)

**Bemerkungen:**

Der Anmelder hat nachträglich ein Sequenzprotokoll  
eingereicht und erklärt, dass dieses keine neuen  
Angaben enthält.

(54) **Peptide als Agonisten und/oder Inhibitoren der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität sowie  
der Verwendung bei der Alzheimer'schen Krankheit, beim Typ II Diabetes mellitus und bei  
spongiformen Encephalopathien**

(57) Die Erfindung betrifft ein Peptid als Agonist  
und/oder Inhibitor der Amyloidbildung, wobei das Peptid  
3 - 15 Aminosäuren aufweist und mindestens die wirk-

same Peptidsequenz GA umfasst.

Sequenz (20-29) von hIAPP:

S N N F G A I L S S

Sequenz (25-34) von β-AP:

G S N K G I I G L

Sequenz (110-119) des PrP:

H V A A G A V V G G

BEST AVAILABLE COPY

Abb. 1: Anordnung der homologen Sequenzen von IAPP, β-AP und dem Prionprotein (PrP). Homologe Reste sind unterstrichen; konservative Substitutionen sind in **fett**.

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Peptide mit 3 - 15 Aminosäuren, die als Agonisten und/oder Inhibitoren der Amyloidbildung und oder Toxizität fungieren und deshalb bei diesbezüglich verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt werden können.

Neue Strategien und Wirkstoffe zur Therapie und Diagnose der o.g. amyloiden Krankheiten sind weltweit stark umforscht. Eine Möglichkeit zur Behandlung dieser Krankheiten mit Medikamenten/Pharmazeutika gibt es jedoch noch nicht. Der vorherrschenden Lehrmeinung nach sind bestimmte, für jede Krankheit spezifische amyloide Proteine durch ihre Amyloidogenese oder Aggregation ursächlich verantwortlich für das Entstehen der amyloiden Krankheiten. Der Mechanismus zur Amyloidogenese und dem damit zusammenhängenden Zelltod (Zytotoxizität) bei diesen Krankheiten ist jedoch weitgehend unbekannt und entsprechende hochspezifische Inhibitoren sind daher noch nicht identifiziert worden. Pharmazeutika zur Behandlung der amyloiden Krankheiten auf der Basis solcher Inhibitoren wurden also ebenfalls noch nicht entwickelt.

Ebenso haben die durch die Amyloidbildung (Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, den sogenannten amyloiden Strukturen) verursachten proteinchemischen, technisch-analytischen Probleme bisher keine Analytik der Amyloidbildung erlaubt. Das hat dazu beigetragen, daß der Mechanismus der Amyloidbildung noch weitgehend unaufgeklärt ist. Auf der Amyloidbildungsanalyse aufbauende diagnostische Verfahren (schnelle *in vitro*-Tests zur Bewertung von Menge, Zeitablauf und Qualität der amyloiden Strukturen) existieren daher bei den genannten Krankheiten ebenfalls noch nicht. Zum Beispiel kann eine Diagnose bei der Alzheimer'schen nur symptomatisch (ansteigende Vergeßlichkeit oder ähnliches) oder *post mortem* durchgeführt werden, es können z.B. keine zuverlässigen Bluttests zu Lebzeiten der Patienten durchgeführt werden.

Ausgehend hiervon ist es deshalb die Aufgabe der Erfindung, geeignete Peptide vorzuschlagen, die als Agonisten und/oder Inhibitoren der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität fungieren können.

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Die Unteransprüche zeigen vor teilhafte Weiterbildungen auf. Die Verwendung der Peptide ist in den Ansprüchen 7 bis 9 angegeben.

Erfindungsgemäß werden danach Peptide mit 3 - 15 Aminosäuren vorgeschlagen, die mindestens die wirksame Sequenz GA enthalten. Es hat sich gezeigt, daß diese Peptidmoleküle als Inhibitoren und/oder Agonisten derjenigen amyloiden Peptide/Proteine fungieren, welche die amyloiden Krankheiten Alzheimer'sche Krankheit, Typ II Diabetes mellitus und Spongiforme Encephalopathien (z.B. Creutzfeld-Jacob-Krankheit, Scrapie Krankheit, BSE) verursachen. Die erfindungsgemäßen Peptidmoleküle sind in der Lage, die Amyloidogenese oder Aggregation der amyloiden Peptide/Proteine  $\beta$ -Amyloides Peptid oder  $\beta$ -AP (bei der Alzheimer'schen Krankheit), Amylin/IAPP (beim Typ II Diabetes mellitus) und Prion-Protein (bei den spongiformen Encephalopathien) zu hemmen. Durch die erreichte Inhibition der Amyloidogenese der krankheitsverursachenden Peptide/Proteine wird auch die durch aggregiertes  $\beta$ -AP, Amylin/IAPP oder Prion-Protein verursachte zytotoxische Wirkung auf Gewebszellen inhibiert.

Die Erfindung bietet folgende Vorteile gegenüber dem Stand der Technik:

- Einfache Chemosynthese in hoher Reinheit und Ausbeute nach gängigen Methoden der Festphasenpeptidsynthese (die hier beschriebenen Peptide sind i.d.R. kürzer als die bisher beschriebenen potentiellen Inhibitoren und bestehen aus nur einer Art Chemischer Bausteine [= Aminosäuren]).
- Hohe biologische Stabilität, die durch den einfachen chemischen Einbau unnatürlicher Aminosäuren noch erhöht werden kann.
- Breite biologische und damit potentiell therapeutische Anwendbarkeit (der hohe Homologiegrad zwischen den entsprechenden Sequenzen der amyloidbildenden Peptide/Proteine ermöglicht den überlappenden Einsatz der Inhibitoren in allen drei Krankheiten).
- Geringe Nebenwirkungen und geringe Antigenizität beim Einsatz als Therapeutikum (die Peptide weisen aufgrund ihrer geringen Größe eine kleine Tendenz zur Induktion von Immunreaktionen im Patienten auf; andere in der Literatur beschriebene Inhibitorkandidaten (siehe oben Antikörper oder höhermolekulare Serumkomponenten und sind ca. 200-300 mal größer als die hier beschriebenen Peptide).
- Hohe biologische Aktivität *in vitro* und damit hohe vorhersagbare biologische Aktivität *in vivo*.
- Damit hohe Vorhersagbarkeit einer therapeutischen Anwendung.

Es hat sich gezeigt, daß für die drei eingangs beschriebenen Anwendungsgebiete jeweils unterschiedliche Peptide besonders geeignet sind, die jedoch alle untereinander Homologie aufweisen (Abb. 1). Nachfolgend werden die einzel-

len Peptide für die drei Gruppen näher erläutert.

Die geeignete Peptidsequenz, welche für die Amyloidbildung und Zytotoxizität von IAPP ausreichend ist, ist die Sequenz FGAIL (Einbuchstabencode), welche die Aminosäurereste 23 - 27 von IAPP umfaßt. Eine Verlängerung dieser Sequenz in Richtung des N-Terminus von IAPP ergibt gleichfalls kleine (< 10 Aminosäurereste) Peptidfragmente, welche Fibrillen (eine geordnete Aggregatstruktur, die typisch für amyloide Krankheiten ist) bilden können und Zytotoxizität aufweisen. Zur spontanen Aggregation, d.h. Herstellung einer übergesättigten Peptidlösung dieser Peptide, wird eine 100 - 100fach höhere Konzentration, verglichen mit IAPP, benötigt. Diese Sequenzen wurden als kleinmolekulare Inhibitoren der Amyloidbildung von IAPP erfolgreich eingesetzt, da sie die kürzeste und für die Aggregation von IAPP notwendige Peptidsequenz enthalten. Diesem Effekt liegt der Aggregationsmechanismus von IAPP und gleichermaßen anderer amyloidbildender Peptide (wie  $\beta$ -AP und dem Prion-Protein) zugrunde. Dabei erfolgt die Aggregation und Amyloidbildung durch eine intermolekulare  $\beta$ -Faltblatt-Bildung, wofür intermolekulare (zwischen den Molekülketten) Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten bestimmter Aminosäurereste notwendig sind. Diese  $\beta$ -Faltblatt-Struktur führt zu einer nicht-konvalenten Bindung zwischen zunächst zwei und anschließend mehreren IAPP-Molekülen, welche daraufhin unlösliche Aggregate/Amyloid-Strukturen bilden. Der Wirkungsmechanismus (Inhibition) der erfundungsgemäßen Peptide besteht darin, die aggregationsfördernden, intermolekularen Wechselwirkungen zwischen zwei IAPP-Molekülen zu unterbinden. Letzteres wird dadurch erreicht, daß die Peptide selber diese Wechselwirkungen mit IAPP eingehen. Somit entsteht eine Kompetition (Agonismus) zwischen IAPP und den Peptiden um die freien "Bindungsstellen" von IAPP. Auf der agonistischen Wirkung dieser Peptide beruht auch ihr potentieller Einsatz als Krankheits-Diagnostika. Dadurch, daß die lösliche Form der Peptide und bzw. niedrige Konzentrationen (micromolar) weder aggregieren noch Zytotoxizität aufweisen, wird ihr Einsatz als Inhibitoren und Typ II-Diabetes-Diagnostika ermöglicht.

Folgende Peptidsequenzen wurden synthetisiert und als Inhibitoren der Amyloidbildung und Zytotoxizität von IAPP eingesetzt: GAIL, FGAIL, NFGAIL, NNFGAIL, NGGAILSS, SNNFGAILSS, wobei die einzelnen Buchstaben für Aminosäuren nach dem Einbuchstabencode stehen. Darüberhinaus werden H-Moleküle der Amidbindungen der obigen Peptidsequenzen durch eine Methyl-Gruppe ersetzt, um die durch  $\beta$ -Faltblattbildung induzierte Aggregation der Peptide zu unterbinden. Die Methyl-Gruppen wurden bei jeder zweiten Amidbindung eingeführt, jedoch variierte die Zahl der eingeführten Methyl-Gruppierungen. Die hergestellten Peptidanaloga enthalten eine Zahl von N-methylsubstituierten Amidbindungen, welche sich zwischen einer und der Hälfte der vorhandenen Amidbindungen pro Molekül erstreckt. Dem Design dieser Klasse von Aggregationsinhibitoren liegt die Überlegung zugrunde, daß durch die Einführung der Methylgruppe bei jeder zweiten Amidbindung die Dimerisierung oder die nicht-kovalente Bindung der kleinmolekularen Peptidsequenzen an IAPP nicht beeinträchtigt, die sonst nachfolgende nicht-kovalente Expandierung der  $\beta$ -Faltblattstrukturen, welche zur Aggregation führt, jedoch weitgehend ausgeschaltet wird. Im folgenden werden repräsentative Beispiele dieser Substanzklasse, welche als Aggregationsinhibitoren von IAPP erfolgreich eingesetzt wurden, benannt: (N-Me)-GA-(N-Me)IL, F(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NF(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NNF(N-Me)-GA-(N-Me)IL, SNNF(N-Me)-GA-(N-Me)IL, NF(N-Me)-GA-(N-Me)ILSS, SNNF(N-Me)-GA-(N-Me)IL, G(N-Me)-AI(N-Me)-L, FG(N-Me)-AL(N-Me)-L, NFG(N-Me)-AI(N-Me)-L, NNFG(N-Me)-AI(N-Me)-L, SNNFG(N-Me)-AI(N-Me)-L, NFG(N-Me)-AI(N-Me)-LSS, SNNFG(N-Me)-AI(N-Me)-LSS, FGA(N-Me)-IL, NFGA(N-Me)-IL, NNFGA(N-Me)-IL, SNNFGA(N-Me)-IL, NFGA(N-Me)-ILSS, SN(N-Me)-NFGAILSS, N-Me)-SN(N-Me)-NFGAILSS, (N-Me)-SN(N-Me)-NF(N-Me)-GAILSS etc.

Bei dem geeigneten Peptid, welches sich für die Amyloidbildung und Zytotoxizität von  $\beta$ -AP einsetzen läßt, handelt es sich um Sequenzbereiche von  $\beta$ -AP, welche sich zwischen den Aminosäuren 25 und 34 befinden. In Analogie zur Sequenz 23 - 27 von IAPP wurde in  $\beta$ -AP die Sequenz 28 - 32 (KGAI) als die geeignete Sequenz, welche für die Amyloidbildung und Neurotoxizität des Gesamtpeptids  $\beta$ -AP ausreicht, gefunden. Aus den gleichen Überlegungen wie im Falle der IAPP-Amyloidbildungsinhibitoren wurden die folgenden zum IAPP homologen  $\beta$ -AP Sequenzen synthetisiert und als Inhibitoren der  $\beta$ -AP-Amyloidbildung und -Neurotoxizität eingesetzt: GAI, KGAI, NKGAI, SNKGAI, GSNGAI, NKGIIGL, GSNKGAIIGL. Fernerhin, wie oben beschrieben, wurden auch Analoga mit substituierten Amidbindungen hergestellt. Die Strukturen dieser Analoga wurden nach dem gleichen Prinzip wie die N-methylierten Inhibitoren der IAPP-Amyloidbildung (siehe oben) designed. Im folgenden werden repräsentative Beispiele dieser Substanzklasse aufgelistet: (N-Me)-GA-(N-Me)II, K(N-Me)-GA-(N-Me)II, NK(N-Me)-GA-(N-Me)II, SNK(N-Me)-GA-(N-Me)II, GSNK(N-Me)-GA-(N-Me)II, NK(N-Me)-GA-(N-Me)IIGL, GSNK(N-Me)-GA-(N-Me)II, G(N-Me)-AI(N-Me)-I, KG(N-Me)-AI(N-Me)-I, NKG(N-Me)-AI(N-Me)-I, SNKG(N-Me)-AI(N-Me)-I, GSNKG(N-Me)-AI(N-Me)-I, NKG(N-Me)-AI(N-Me)-IGL, GSNKG(N-Me)-AI(N-Me)-IGL, KGA(N-Me)-II, NKGA(N-Me)-II, SNKGA(N-Me)-II, GSNKGA(N-Me)-IIGL, GS(N-Me)-NKGAIIGL, (N-Me)-GS(N-Me)-NKGAIIGL, (N-Me)-GS(N-Me)-NK(N-Me)-GAIIGL etc.

Die geeignete Sequenz, welche für die Amyloidbildung und Zytotoxizität von PrP ausreichend ist, ist AGAVV. Es handelt sich hier um eine Teilsequenz aus der Sequenz 110 - 119 PrP. Weitere Sequenzen, die als Aggregations und Toxizitätsinhibitoren von PrP Verwendung finden, sind: GAIL, AAGAVV, VYYGAVV, HVAAGAVV, AAGAVVGG, HVA-GAVVGG. Auch die entsprechenden N-methylierten Peptidsequenzen - analog zu den IAPP-Derivaten (siehe oben) - sind als Aggregations- und Toxizitätsinhibitoren geeignet. Im folgenden werden einige repräsentative Beispiele der N-methylierten Analoga aufgeführt. (N-Me)-GA-(N-Me)VV, A(N-Me)-GA-(N-Me)VV, AA(N-Me)-GA-(N-Me)VV, AAGA(N-

Me)-VVGG, HV(N-Me)-AAGAVVGG, (N-Me)-HV(N-Me)-AAGAVVGG, (N-Me)-HV(N-Me)-AA(N-Me)-GAVVGG etc.

Bei der Erfindung handelt es sich somit um peptidische Moleküle, welche als Grundstrukturen (Templatmoleküle) zur Inhibition und Analyse der Amyloidbildung und Zytotoxizität bei amyloiden Krankheiten verwendet werden können. Dabei wirken diese Peptide auf die für die amyloiden Krankheiten verantwortlichen Moleküle (ihrerseits amyloidbildende Peptide und Proteine ein. Die Peptide sind somit entweder selber Inhibitoren oder Agonisten der Amyloidbildung und Zytotoxizität oder können als Template für die Identifizierung und Herstellung weiterer Inhibitoren und Agonisten dienen oder können als molekulare Werkzeuge bei der Analyse eingesetzt werden.

Diese Peptide finden Anwendung als pharmazeutische Inhibitoren der Amyloidbildung und Zytotoxizität oder als molekulare Werkzeuge zur Analyse der Amyloidbildung und Zytotoxizität bei amyloiden Krankheiten. Somit handelt es sich um potentielle Pharmaka und Analytika zur Behandlung und Diagnose folgender auch beim Menschen vorkommender Krankheiten:

Alzheimer'sche Krankheit,

Typ II Diabetes mellitus,

15 Sponigiforme Encephalopathien (z.B. Creutzfeld-Jacob-Krankheit, Scrapie-Krankheit, BSE).

Die diagnostische Anwendung umfaßt zwei Aspekte:

- Verwendung als molekulares Werkzeug zur weiteren Erforschung des Mechanismus der Amyloidbildung bei diesen Krankheiten (Einsatz in Forschungslabors und F&E-Labors).
- Potentielle Verwendung als Reagenz zur Diagnostik amyloider Krankheiten bzw. der Vorhersage solcher Krankheiten (Diagnostika-Markt).

Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

25 NFGAIL: Herstellung, Charakterisierung, Aggregation, Testung der Fibrillenbildung, Testung der Zytotoxizität, Testung der inhibitorischen Wirkung auf die Aggregation von IAPP.

- Herstellung und Charakterisierung

30 NFGAIL wurde nach gängigen Methoden der Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Es wurde der Wang-Anker verwendet, und die Fmoc/tBu-Synthesestrategie eingesetzt. Für einen 1 mM Ansatz wurden 4 mmol der geschützten Aminosäuren 4 mmol TBTU und 6 mmol DIEA in DMF pro Kupplungsschritt verwendet. Die Abspaltung der temporären Schutzgruppen (Fmoc) erfolgte mittels 25 % Piperidin in DMF und für die Abspaltung des Peptides vom Anker unter gleichzeitiger Abspaltung der permanenten Schutzgruppen der Seitenketten wurde 95 % TFA verwendet (Reaktionszeit 2 h). Das Rohrprodukt wurde durch präparative RP-HPLC gereinigt und durch FAB-MS und Aminosäureanalyse charakterisiert.

- Aggregation und Testung der Fibrillenbildung

40 Die Aggregationseigenschaften wurden in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.4 getestet. Zunächst wurde eine hochkonzentrierte (125 - 250 mM) Stammlösung des Peptides in DMSO hergestellt. Aus dieser Lösung wurde das Peptid direkt in die Aggregationslösung unter mildem Rühren pipettiert. Eine 5 mM Peptidlösung aggregierte spontan und wies somit keine "Aggregations-Lag-Time" auf. dagegen hat sich Aggregat erst nach 9 1/2 h gebildet aus einer Lösung von 3,75 mM NFGAIL (Aggregations-Lag-Time: 9 1/2 h) (Abb. 2). Fernerhin erfolgte sofortige Aggregation, wenn vorgefertigte NFGAIL Fibrillen (Nukleationskeime) zu der 3,75 mM Lösung addiert wurden (Fibrillenkonzentration 0,375 mM). Somit wurde gezeigt, daß die Aggregation dieser Peptide nach dem sogenannten "nukleations-abhängigen Polymerisationsmechanismus" verläuft. Letzteres ist von großer Bedeutung, da in der Literatur die Meinung herrscht, daß die Amyloidbildung (in vitro) durch diesen Mechanismus verlaufen soll. Nach vollständiger Aggregation wurde das Präzipitat durch Zentrifugation isoliert und durch Elektronen- und Polarisationsmikroskopie nach Kongorot Färbung untersucht. Dadurch wurde die fibrilläre und amyloide Struktur des Aggregats bestätigt (Abb. 3).

- Testung der Zytotoxizität

50 Suspensionen der Peptidaggregate (hergestellt wie oben beschrieben) wurden mittels einer Rat Insulinoma (RIN5mf) und einer humanen Astrogloma-Zelllinie (HTB-14) auf Toxizität getestet. Die frisch gelösten Peptide wurden ebenso auf Zytotoxizität getestet. Somit konnte gezeigt werden, daß die aggregierte Form von NFGAIL zytotoxisch ist, wobei die lösliche Form des Peptides keine Toxizität aufwies (Abb. 4).

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Fraunhofer Gesellschaft zur Foerderung der  
angewandten Forschung e.V.  
(B) STRASSE: Leonrodstr. 54  
(C) ORT: Muenchen  
10 (D) BUNDESLAND: Freistaat Bayern  
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 80636

15 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Peptide als Agonisten und/oder Inhibitoren  
der Amyloidbildung und Zytotoxizität sowie der Verwendung  
bei der Alzheimerschen Krankheit, beim Typ II Diabetes  
mellitus und bei spongiformen Encephalopathie

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTR GER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

25 (v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: EP 98110629.7

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: DE 19725619.8  
(B) ANMELDETAG: 17-JUN-1997

30 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) L NGE: 4 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

(iv) ANTISENSE: NEIN

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly Ala Ile Leu

1

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) L NGE: 5 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

EP 0 885 904 A1

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

10 Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 6 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

35 Asn Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 7 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

60 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

65 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

70 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

75 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

80 Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 10 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser  
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 4 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gly Ala Ile Ile  
1

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 5 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

EP 0 885 904 A1

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

10 Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 6 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

35 Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 7 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKËLS: Peptid

5

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
1 5

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 10 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKËLS: Peptid

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
1 5 10

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 5 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKËLS: Peptid

35

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Ala Gly Ala Val Val  
1 5

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 6 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKËLS: Peptid

50

EP 0 885 904 A1

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

10 Ala Ala Gly Ala Val Val  
1 5

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 7 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

35 Val Ala Ala Gly Ala Val Val  
1 5

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

55 His Val Ala Ala Gly Ala Val Val  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

60 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L NGE: 8 Aminos,uren  
(B) ART: Aminos,ure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

65 (ii) ART DES MOLEKELS: Peptid

70 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

75 Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) L\_NGE: 10 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

His Val Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly  
1 5 10

25 Patentansprüche

1. Peptid als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid 3 - 15 Aminosäuren aufweist und mindestens die wirksame Peptidsequenz GA umfaßt.

2. Peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es maximal 10 Aminosäuren aufweist.

3. Peptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die wirksame Peptidsequenz GAI umfaßt.

4. Peptid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine der folgenden Peptidsequenzen GAIL, FGAIL, NFGAIL, NNFGAIL, SNNFGAIL, NFGAILSS oder SNNFGAILSS gebildet ist.

5. Peptid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine der folgenden Peptidsequenzen GAI, KGAI, NKGAI, SNKGAI, GSNKGAI, NKGAIIGL oder GSNKGAIIGL gebildet ist.

6. Peptid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine der folgenden Peptidsequenzen AGAVV, AAGAVV, VYYGAVV, HVAA-GAVV, AAGAVVGG oder HVAAGAVVGG gebildet ist.

7. Peptid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Wasserstoffmolekül der Amidbindung in der Sequenz durch eine Methylgruppe ersetzt ist.

8. Peptid nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß jedes zweite Wasserstoffmolekül durch eine Methylgruppe ersetzt ist.

9. Verwendung eines Peptids nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, zur Herstellung eines Arzneimittels als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität bei Typ II Diabetes mellitus.

**EP 0 885 904 A1**

**10. Verwendung eines Peptids nach mindestens einem der Ansprüche 1, 3 und 5,  
zur Herstellung eines Arzneimittels als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung und/oder der Zytotoxizität bei  
der Alzheimer'schen Krankheit.**

**5 11. Verwendung der Peptide nach mindestens einem der Ansprüche 1, 2 und 6,  
als Agonist und/oder Inhibitor der Amyloidbildung und/oder Zytotoxizität bei spongiformen Encephalopathien.**

**10**

**15**

**20**

**25**

**30**

**35**

**40**

**45**

**50**

**55**

Sequenz (20-29) von hIAPP:	S N <u>N</u> F <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> L S S
Sequenz (25-34) von $\beta$ -AP:	G S <u>N</u> K <u>G</u> <u>A</u> <u>I</u> I <u>G</u> L
Sequenz (110-119) des PrP:	H V A A <u>G</u> <u>A</u> V V <u>G</u> G

Abb. 1: Anordnung der homologen Sequenzen von IAPP,  $\beta$ -AP und dem Prionprotein (PrP). Homologe Reste sind unterstrichen; konservative Substitutionen sind in **fett**.

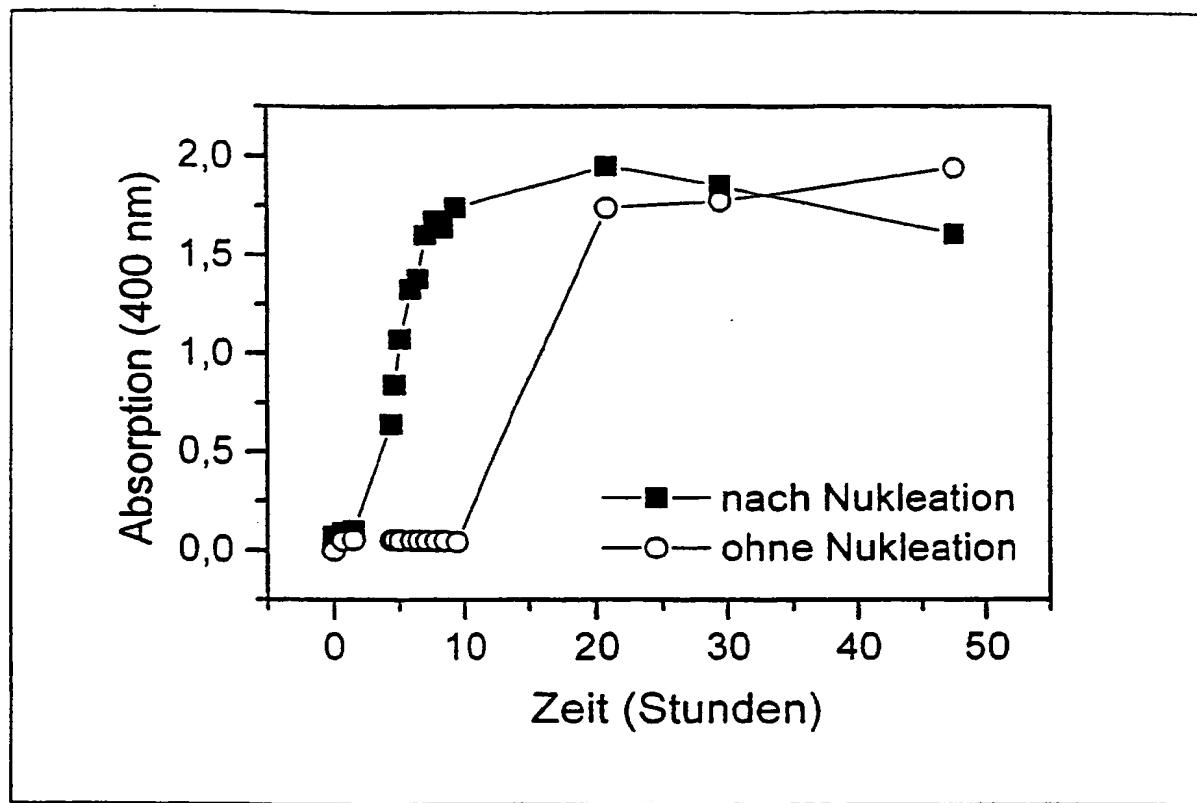


Abb. 2: Aggregation von NFGAIL. Dabei wurde die Absorption bei 400 nm als Indikator für die Fibrillenbildung (Lichtstreuung an partikulären Bestandteilen) in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.



Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von NFGAIL-Aggregaten.

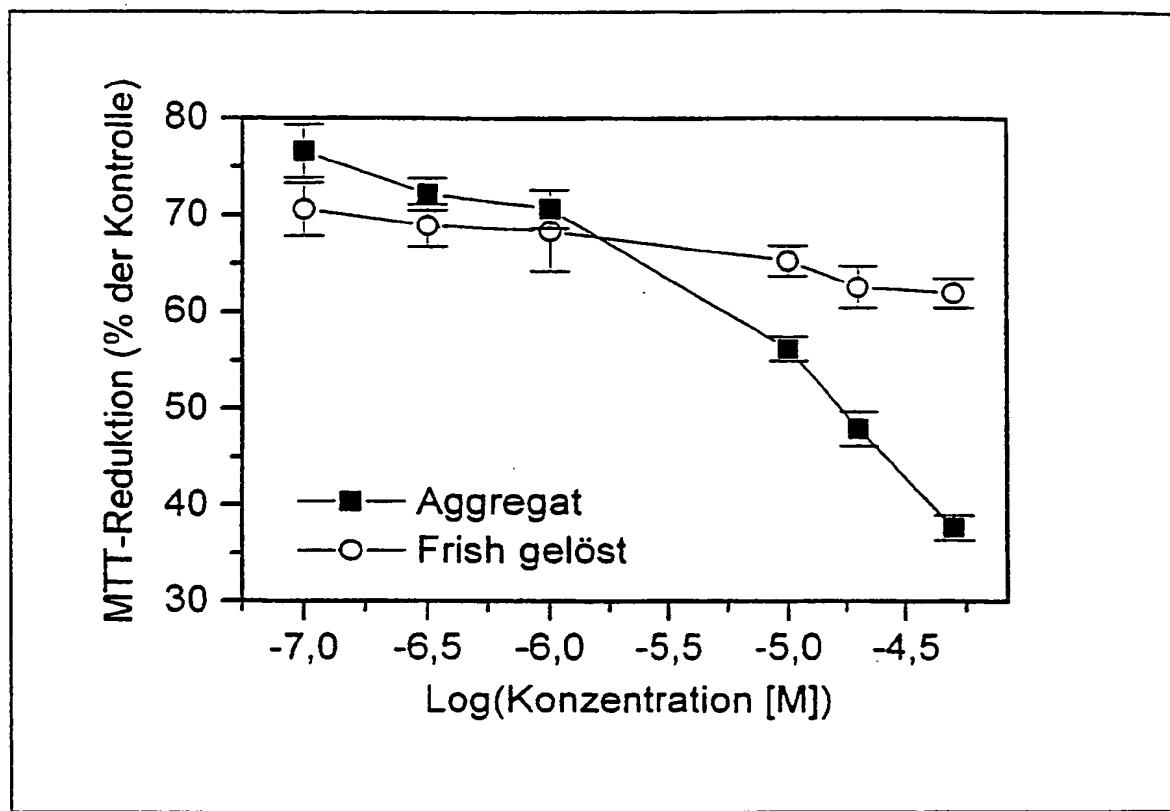


Abb. 4: Testung der Zytotoxizität von NFGAIL. Der Umsatz des Farbstoffs MTT wurde als Maß für die Zellvitalität nach bekannten Protokollen in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz gemessen.

Europäisches **EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT**

Patentamt

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
Übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 98 11 0629

**EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE**

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betritt Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	WO 96 39834 A (UNIV NEW YORK) 19. Dezember 1996 * Seite 8, letzter Absatz * * Seite 14, Absatz 1 * SEQ.ID.23 * Seite 16, letzter Absatz; Ansprüche * ---	1,2,6, 9-11	C07K14/575 C07K7/06 C07K14/47 A61K38/22
X	EP 0 289 287 A (AMYLIN CORP) 2. November 1988 * Seite 2, Zeile 62 * * Seite 3, Zeile 9; Ansprüche 10,11,30 * ---	1-4,9-11	
X	EP 0 309 100 A (AMYLIN CORP) 29. März 1989 * Seite 2, Zeile 45 - letzte Zeile; Anspruch 1 * ---	1-4,9-11 -/-	
<b>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</b>			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPÜ in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Obwohl der Anspruch 11 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>			C07K A61K
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>	Abschlußdatum der Recherche <b>29. September 1998</b>	Prüfer <b>Cervigni, S</b>	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze  E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  D : in der Anmeldung angeführtes Dokument  L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument  &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichttechnische Offenbarung P : Zwischenliteratur			



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.CI6)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrieft Anspruch	
X	K. GANOWIAK ET AL: "Fibrils from synthetic amyloid-related peptides enhance development of experimental AA-amyloidosis in mice" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., Bd. 199, Nr. 1, 1994, Seiten 306-312, XP002077761 ORLANDO, FL US * Seite 307, Absatz 3 *	1-4-	
X	WO 96 07425 A (UNIV WASHINGTON ; PERLMUTTER DAVID H (US)) 14. März 1996 * Seite 8, Absatz 1 *	1-3,5, 9-11	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.CI6)

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox

This Page Blank (uspto)